

INHIBICIÓN EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM POR EFECTO DE PRODUCTOS EXTRACELULARES DE LA POTENCIAL CEPA PROBIÓTICA *SHEWANELLA PUTREFACIENS* PDP11

M. Domínguez-Maqueda^{1}, M.C. Balebona¹ M.A. Moriño¹*

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España, martadm@uma.es¹

Línea temática (y, en su caso, sub-área): El mar como fuente de recursos.

Modalidad de participación: póster.

Abstract

Extracellular products from *Shewanella putrefaciens* Pdp11 have been obtained under different conditions of temperature and time of incubation, demonstrating its capability to exert an inhibitory effect in biofilm formation of fish pathogens such as *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum gallaecium*, *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. No effect has been observed for *Tenacibaculum maritimum* biofilm formation.

Palabras clave: *Shewanella putrefaciens* Pdp11, productos extracelulares (PEC), inhibición de biofilm.

Introducción

Las biopelículas son comunidades multicelulares densas, sésiles que se adhieren a superficies bióticas o abióticas por secreción de sustancias poliméricas en respuesta a señales ambientales, además de ser una fuente importante de infecciones por parte de microorganismos. Pdp11 ha demostrado ejercer efectos probióticos en peces cultivados como *Sparus aurata* y *Solea senegalensis*. El presente trabajo estudia esta capacidad en el contexto de su secretoma a partir de PEC de Pdp11 extraídos en diferentes condiciones para evaluar su capacidad de inhibir la formación de biopelículas, controlando la patogenicidad de ciertos microorganismos.

Material y métodos

Pdp11 fue cultivado en caldo tripticasa de soja suplementado con 1,5% de cloruro sódico (TSBs) a 23°C y 15°C durante 36h en agitación (80 r.p.m). Placas de TSBs suplementado con 1,5% de agar (TSBs agar) se cubrieron con papel celofán estéril según describe Liu et al. 1957. Las placas se incubaron a 23°C y 15°C durante 24h y 48h, respectivamente, tras lo cual se recogieron los PEC con 2mL de tampón fosfato salino (PBS) y se centrifugaron a 10000xg, 20min, 4°C. El sobrenadante se filtró por filtros de membrana de 0.45- y 0.2µm de diámetro de poro y se congeló a -80°C hasta su uso.

La inhibición en la formación de biofilm se llevó a cabo según la técnica de tinción de cristal violeta (CV) descrita por Acosta et al., 2021. Los microorganismos patógenos, *V. anguillarum* y *A. hydrophila* se cultivaron en TSBs y *T. maritimum*, *T. soleae* y *T. gallaecium* en medio marino (MM), todos a 25°C, ajustándose a una DO 600nm = 0,1A. De cada cultivo ajustado se añadieron 20µL (5 réplicas) en placas de 96 pocillos de poliestireno, a los que se le añadieron 100µL de TSBs y MM estéril doble concentrado según el patógeno. Las placas se incubaron durante 48h a 25°C en estático, y se añadieron 100µL de PEC al inicio (0h) y tras 24h de incubación. El estadístico se llevó a cabo a partir de un ANOVA de un factor (p<0.5).

Resultados y discusión

La mayoría de los patógenos que forman biofilm aumentan su probabilidad de supervivencia, ya que ven favorecida su diseminación en el ambiente o en el hospedador, además de disponer de una comunicación

célula-célula que les permite en muchos casos la secreción de moléculas disruptoras (Torres et al., 2019). La figura 1 muestra el efecto inhibitorio en la formación de biofilm de patógenos piscícolas por parte de los PEC de Pdp11. En este sentido, la identificación de una función derivada de Pdp11 en la represión de biopelículas de patógenos de peces amplía el conocimiento y la aplicación de un papel probiótico que mejore y proteja el cultivo de peces en acuicultura.

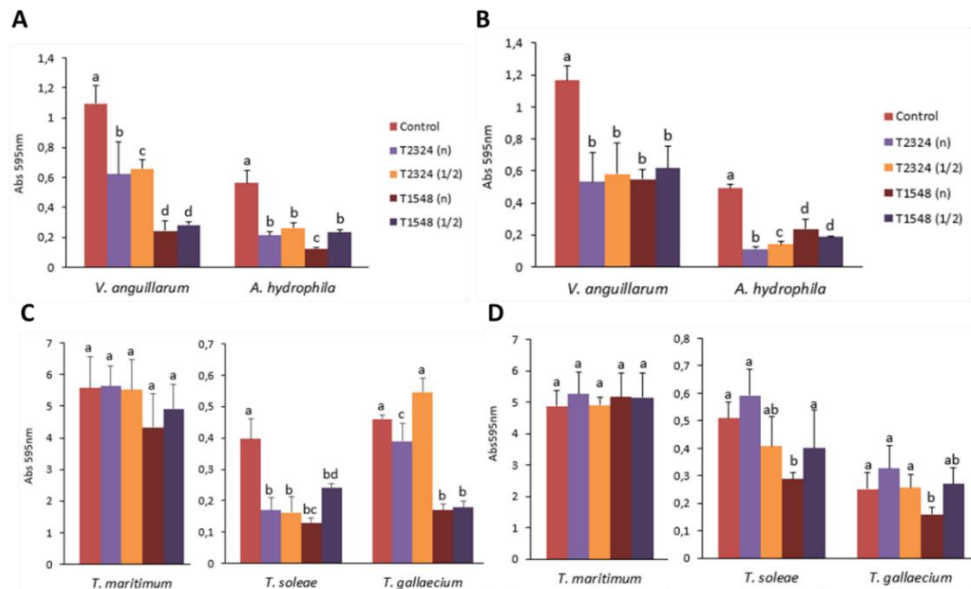


Figura 1. Inhibición de biofilm por parte de los PEC de Pdp11 añadidos a tiempo 0h (1A,1C) y tras 24h de incubación (1B,1D) sobre patógenos piscícolas. T2324 hace referencia a PEC recogidos de medio TSBs agar, incubados a 23°C durante 24h, y T1548 a PEC recogidos de medio TSBs agar, incubados a 15°C durante 48h. El paréntesis (n) indica una concentración total añadida de PEC de 50µg, y (1/2) de 25µg para cada tratamiento en todos los casos.

Conclusiones

Los PEC de Pdp11 no afectan al biofilm de *T. maritimum*.

El efecto inhibitorio es más notable cuando los PEC se añaden a tiempo 0h.

El tratamiento T1548(n) es el más efectivo en la mayoría de los casos.

Las concentraciones ensayadas de PEC afectan de forma similar a las biopelículas de los patógenos.

Bibliografía

LIU, P V. 1957. "Survey of Hemolysin Production among Species of Pseudomonads." Journal of bacteriology 74(6): 718–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13502298> (May 12, 2019).

Acosta, Félix, Daniel Montero, Marisol Izquierdo, and Jorge Galindo-Villegas. 2021. "High-Level Biocidal Products Effectively Eradicate Pathogenic γ -Proteobacteria Biofilms from Aquaculture Facilities." Aquaculture 532(July 2020): 736004.

Torres, M., Dessaux, Y., & Llamas, I. (2019). Saline environments as a source of potential quorum sensing disruptors to control bacterial infections: A review. Marine drugs, 17(3), 191.

Agradecimientos

This study was supported by MINECO (grant no. AGL2017-83370-C3-3-R) and FEDER funds.